

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES PARA
IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA VIA COPOLIMERIZAÇÃO
DE MATRIZES ORGÂNICA E INORGÂNICA POR
TECNOLOGIA SOL-GEL**

Autor: Tales Romano

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz

Dourados-MS
Fevereiro - 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES PARA
IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA VIA COPOLIMERIZAÇÃO
DE MATRIZES ORGÂNICA E INORGÂNICA POR
TECNOLOGIA SOL-GEL**

Autor: Tales Romano

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz

“Trabalho de conclusão de curso apresentado, como parte das exigências para obtenção do título de BACHAREL EM BIOTECNOLOGIA, no curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados”.

Dourados-MS
Fevereiro – 2014

“Eu prefiro ser,
Essa metamorfose ambulante,
Do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo”.

Raul Seixas.

Dedico este trabalho aos meus pais, Aldegar e Lucilene, que de tudo fizeram para minha formação, aos meus irmãos Giovana, Paula e Andréi pelo companheirismo e confiança e a Marcela, pela presença marcante em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças nas horas mais difíceis.

À minha família, pelo apoio e dedicação.

À Marcela, pela presença, companheirismo e amor.

Ao Professor Dr. Marcelo pela possibilidade de realização do trabalho, orientação e amizade.

Ao Professor Dr. Hernane Barud, pela disponibilização do material para o projeto, paciência, dedicação e amizade.

Ao pessoal de Araraquara, pela recepção e acolhimento durante os dias que fiquei lá.

À segunda turma de Biotecnologia, pela convivência e companheirismo durante esses 4 anos.

Muito Obrigado.

RESUMO

A utilização de catalisadores biológicos vem crescendo juntamente com a demanda para a obtenção de produtos, surgindo assim novas tecnologias para auxiliar na aceleração desse processo. Os suportes para a imobilização de catalisadores é uma tecnologia que vem se desenvolvendo em virtude das divergentes necessidades requeridas por processos industriais. O objetivo deste trabalho foi desenvolver novos suportes pela metodologia sol-gel entre os materiais polifosfato, alginato de sódio, carboximetilcelulose e quitosana. O procedimento consistiu na copolimerização dos materiais com diferentes proporções seguidas de secagem em estufa a 60°C por 24 horas e tratamento térmico por 72 horas, sendo que a cada 24 horas a temperatura era aumentada em 100°C, iniciando em 300°C. O polifosfato puro (100%) foi adotado como padrão e as combinações entre o polifosfato e: alginato de sódio, carboximetilcelulose e a quitosana foram testadas para avaliar a possibilidade de utilização desses materiais como suportes para imobilizar enzimas. As variações na proporção foram de, respectivamente, 80% / 20% e 50% / 50% para todos os materiais, ou seja, polifosfato e alginato de sódio na combinação de 80% / 20% e 50% / 50% o que se repete para as outras combinações. De acordo com as análises empregadas de difração de raio X (DRX), análise de termogravimetria (TG) e pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) a amostra entre o polifosfato e a quitosana, na proporção de 50% de cada material, apresentou as melhores características como suporte para imobilizar enzimas.

Palavras-chave: copolimerização; suportes; análises físico-químicas.

Sumário

1- INTRODUÇÃO	21
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 ENZIMAS	11
2.2 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	12
2.3 ALGINATO	15
2.4 CARBOXIMETILCELULOSE	16
2.5 QUITOSANA	17
2.6 PROCESSO SOL-GEL	18
3- OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo Geral.....	19
4.2 Objetivos Específicos.....	20
4- METODOLOGIA	20
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
5.2 FORMAÇÃO DOS XEROGÉIS	20
5.3 ANÁLISES	21
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6- CONCLUSÃO	32
7- REFERÊNCIAS	33

Lista de Abreviações

CMC: Carboximetilcelulose.

SiCl₄: Tetracloreto de Silício.

DRX: Difração de Raio X.

TG: Termogravimetria.

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura.

CaCl₂: Cloreto de Cálcio.

BET: Braunauer, Emmet e Teller.

Lista de Figuras

Figura 1: Organograma da classificação dos métodos de imobilização.....	13
Figura 2: Gráfico da evolução do número de publicações científicas em periódicos internacionais indexados, referentes ao termo “imobilização celular”, nos últimos 50 anos (Fonte: Web of Science Data Base “on-line”). Fonte: Covizzi, et al., 2007.	15
Figura 3: composição dos alginatos: a) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos; b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos; c) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos alternados. Adaptado de: Kawaguti e Sato, 2008; Rodrigues, 2010.	16
Figura 4: Estrutura química da Carboximetilcelulose. Fonte: KÄISTNER et al., 1996 & ROHR, 2007.	17
Figura 5: Estrutura química da Quitosana. Fonte: Azevedo et al., 2007.	17
Figura 6: Reação química de hidrólise, seguida pela condensação para a síntese sol-gel. Fonte: SILVA (2009).	19
Figura 7: Análise de DRX do xerogel obtido por processo sol-gel entre polifosfato e alginato de sódio. Sendo A, D e G o polifosfato controle (100%). 7- B, E e H, respectivamente o polifosfato (80%) combinado com o alginato (20%), carboximetilcelulose (20%) e quitosana (20%) e C, F e I é a combinação 50% entre os materiais.	23
Figura 8: Análise de Termogravimetria do xerogel formado por processo sol-gel entre o polifosfato e o alginato de sódio. A figura 8-A é o polifosfato padrão (100%). A figura 8-B é o polifosfato (80%) combinado com alginato (20%) e a figura 8-C é a combinação 50% / 50% entre os materiais.....	24
Figura 9: Análise de termogravimetria do xerogel formado por processo sol-gel entre o polifosfato e a carboximetilcelulose. A figura 9-A é o polifosfato padrão (100%). A figura 9-B é o polifosfato (80%) combinado com carboximetilcelulose (20%) e a figura 9-C é a combinação 50% entre os materiais..	26
Figura 10: Análise de termogravimetria do xerogel formado por processo sol-gel entre o polifosfato e a quitosana. A figura 10-A é o polifosfato padrão, a figura 10-B é o polifosfato (80%) combinado com quitosana (20%) e a figura 10-C é a combinação 50% / 50% entre os materiais.	27
Figura 11: Análise de microscopia eletrônica de varredura com aumento de 20.000 vezes, onde o A é o polifosfato 100%, o B é o polifosfato (80%) e alginato(20%) e o C é o polifosfato (50%) alginato (50%).	29
Figura 12: Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura com aumento de 20.000 vezes, onde o A é o polifosfato 100%, o B é o polifosfato (80%) e carboximetilcelulose (20%) e o C é o polifosfato (50%) e CMC (50%).	30
Figura 13: Análise de microscopia eletrônica de varredura com aumento de 20.000 vezes, onde o A é o polifosfato 100%, o B é o polifosfato (80%) e quitosana (20%) e o C é o polifosfato (50%) e quitosana (50%).	31

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação entre os métodos de imobilização.	13
---	----

1- INTRODUÇÃO

As enzimas são utilizadas pelo homem desde a antiguidade para a fabricação de pão e vinho e tem ganhado interesse do setor industrial devido apresentarem vantagens para o processo. A utilização de enzimas no setor industrial surgiu em substituição à utilização de catalisadores químicos, que apresentam algumas desvantagens que são: necessidade de altas temperaturas, produção de produtos com composição química mista e necessidade de um processo de purificação para a finalização do produto, em contrapartida a utilização de enzimas devido a alta especificidade geram produtos com composição química conhecida e requererem condições amenas de temperatura e pH e geram subprodutos degradáveis. No entanto as enzimas quando aplicadas livres ao processo podem ser lixiviadas e estão mais suscetíveis a variações, mesmo que pequenas, nas condições de meio de cultivo. A utilização de suportes para imobilizar enzimas é importante, devido ao fornecimento de proteção para a enzima em relação ao meio de cultivo, variações na temperatura, pH e agentes desnaturantes. A metodologia do trabalho consistiu na copolimerização pela tecnologia sol-gel entre os materiais inorgânico polifosfato e os materiais orgânicos alginato de sódio, carboximetilcelulose e quitosana, com o objetivo de caracterizar por análises físico-químicas para avaliação da característica dos materiais e sua aplicabilidade como suporte para imobilização de enzimas.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENZIMAS

As enzimas, em grande maioria, são classificadas como proteínas globulares unidas por ligações peptídicas, e de acordo com Galvão (2004), com exceção de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA, todas as enzimas são proteínas. Recebem a denominação de catalisadores biológicos, pois, diminuem a energia de ativação necessária para que uma reação ocorra, aceleram uma reação termodinamicamente possível e não alteram a constante de equilíbrio e a energia livre de reação (GÜRSEL et al., 2003; ISIK et al., 2003).

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, exercendo a função de catalisadores das vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular e podem ser de diferentes origens, como sugerem os autores (BON et al., 2008; dos SANTOS 2010) as enzimas provenientes de microrganismos são as mais utilizadas na indústria por apresentarem algumas vantagens.

De acordo com os autores, Hassan, Shah e Hameed (2006) e de Castro et al. (2004), os catalisadores químicos empregados em processos industriais possuem baixa especificidade, geram produtos com composição química mista, necessitando de um processo “down stream”, apresentam baixa versatilidade e necessitam de altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação.

A utilização de biocatalisadores em processos químicos iniciou-se na década de 1960, aliada a imobilização enzimática (KRAJEWSKA, 2004). Devido a alta demanda pela utilização de enzimas em processos industriais tem se buscado, cada vez mais, novos catalisadores para tais fins. Com o intuito de explorar o potencial que essa tecnologia oferece, atualmente são desenvolvidas novas metodologias em conjunto com ferramentas modernas de biologia molecular e modos diferenciados de seleção, para prospectar enzimas mais robustas e com maior aplicabilidade (DE CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001).

De acordo com Mendes et al. (2011), a utilização de enzimas se divide em três segmentos, sendo as mais utilizadas as da indústria de alimentos e as técnicas, onde juntas detém aproximadamente 50% do total de enzimas comercializadas. A movimentação financeira segundo o site “Companies and Markets” (<http://www.companiesandmarkets.com>) é de que o mercado de enzimas movimentou em 2010, cerca de US \$ 3,3 bilhões e estima-se que em 2015 o mercado atinja valores na ordem de US \$ 4,4 bilhões.

Nos trabalhos de Hassan, Shah e Hameed (2006), de Castro et al. (2004) e Krajewska (2004), relatou-se que as vantagens na utilização de enzimas é que não há produção de subprodutos indesejáveis, atuam em condições baixas de pH, temperatura e pressão, possuem velocidade de reação maior que a dos catalisadores químicos, devido a alta especificidade geram maiores rendimentos, permitem a obtenção de produtos biodegradáveis, conseqüentemente reduzindo a geração de resíduos, entre eles águas residuais e diminuição do custo final do processo.

As enzimas aliadas a suportes para fixação ganham mais robustez e maior estabilidade quando comparadas a enzimas livres. De acordo com Carvalho, Canilha e da Silva (2006), com a utilização de suportes é possível, ao final do processo, recuperar as enzimas, fornecer maior proteção contra pH, temperatura e agentes desnaturantes e, ainda, segundo Beynum (1980) podem ser utilizadas em processos contínuos com maior facilidade.

2.2 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Segundo a afirmação de Guisan (2006) e Mendes et al. (2011), a imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso. A metodologia para ligação entre a enzima e o suporte ainda é bastante discutida, não apresentando um consenso entre os autores. Para alguns autores, como Gerbsch e Buchholz (1995) a imobilização de enzimas ou biocatalisadores pode ser de quatro tipos: ligação a superfícies, aprisionamento em matrizes porosas, contenção por membranas e auto-agregação. Outros autores detalham mais essa subdivisão, dando ênfase a cada divisão da classificação de suportes para imobilização de biocatalisadores, sendo eles: ligação a superfícies (adsorção natural ou ligação química); aprisionamento em matrizes porosas (gel ou em suportes pré-formados); contenção por barreiras ou membranas (aprisionamento em fase ou barreiras pré-formadas) e por último a auto-agregação (podendo ser natural ou artificial) (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

De acordo com Fernandez, Lima e Lopes (2010), as ligações podem ser de acordo com o organograma da tabela 1, e segundo Mendes et al., (2011) dentre estes métodos o mais simples e mais utilizado é o método de ligação ao suporte pela adsorção física, onde interações fracas como pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e ligações iônicas interagem com o suporte.

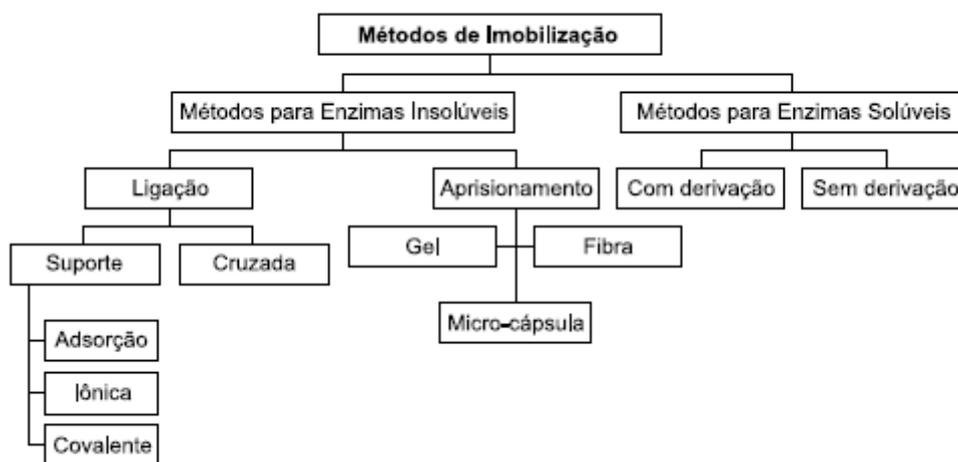


Figura 1: Organograma da classificação dos métodos de imobilização.

Fonte: Fernandez, Lima e Lopes (2010).

A tabela 1 fornece dados sobre os tipos de ligação entre a enzima o suporte e as características referentes aos processos. Através desta tabela é possível escolher determinada forma de ligação da enzima com o suporte, visto que são abordadas informações relevantes aos processos industriais como o custo e a estabilidade.

Tabela 1: Comparação entre os métodos de imobilização.

Características	Ligações cruzadas	Adsorção Física	Ligação Iônica	Ligação Metálica	Ligação Covalente	Oclusão
Preparação	Intermediário	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força da ligação	Forte	Fraca	Intermediária	Intermediária	Forte	Intermediário
Atividade	Baixa	Intermediária	Alta	Alta	Alta	Baixa
Recuperação do suporte	Impossível	Possível	Possível	Possível	Rara	Impossível
Custo	Intermediário	Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Intermediário
Estabilidade	Alta	Baixa	Intermediário	Intermediário	Alta	Baixa
Aplicabilidade geral	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Proteção microbiana	Intermediário	Não	Não	Não	Não	Sim

Fonte: Chibata, 1978; Kennedy & Cabral 1987; Dos Santos, 2010.

Ao comparar a imobilização de enzimas com células livres, a imobilização eleva a atividade fermentativa da levedura, pois, elimina a fase “lag” de crescimento devido à adaptação rápida da célula com o meio fermentativo em bateladas sucessivas (DURAN; BAILEY, 1986; MENDES, 2011). Em sistemas contínuos diminui-se o risco de contaminação, ocorre redução na formação de subprodutos por células residuais e elimina a necessidade de remoção das células, tornando o processo mais eficiente (WILLIAMS; MUNNECKE, 1981; MENDES et al., 2011).

Além de diferentes métodos de ligação das enzimas ao suporte, existem diferentes agentes imobilizados. Alguns autores citam que a eficiência varia de acordo com o que se imobiliza podendo ser enzima, célula ou microrganismo (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). Ao aplicar suportes para imobilizar enzimas é necessário levar em conta as necessidades que o processo requer, havendo variações na aplicabilidade para diferentes suportes e enzimas.

Alguns processos industriais que necessitam de cofatores para seu andamento, não são indicados à aplicação de enzimas imobilizadas, visto que será necessário adicionar tais cofatores ao processo, o que acaba gerando maiores custos ao processo. Uma alternativa é a imobilização de células ao invés de enzimas, pois elas possuem a capacidade de regenerar os cofatores de maneira natural, além de que aumentam a eficiência dos processos fermentativos, permitindo a sua reutilização, reduzindo o custo de produção, e aumentam a proteção das células contra inibidores (pH, temperatura e agentes desnaturantes) (CORCORAN, 1985).

Além da imobilização de enzimas e imobilização celular, existe também a técnica de imobilização de microrganismo. Essa técnica segundo Fenice et al. (2000) e Covizzi et al. (2007), foi eficaz para a produção de pigmento pelo fungo *Monascus purpureus*, sendo que resultou no aumento de produtividade do mesmo quando comparado a outros processos.

O figura 2 é um gráfico que relata a importância que a utilização de suportes para imobilização de catalisadores vem ganhando com o passar dos anos, tendo em vista as vantagens que estes trazem para os processos industriais.

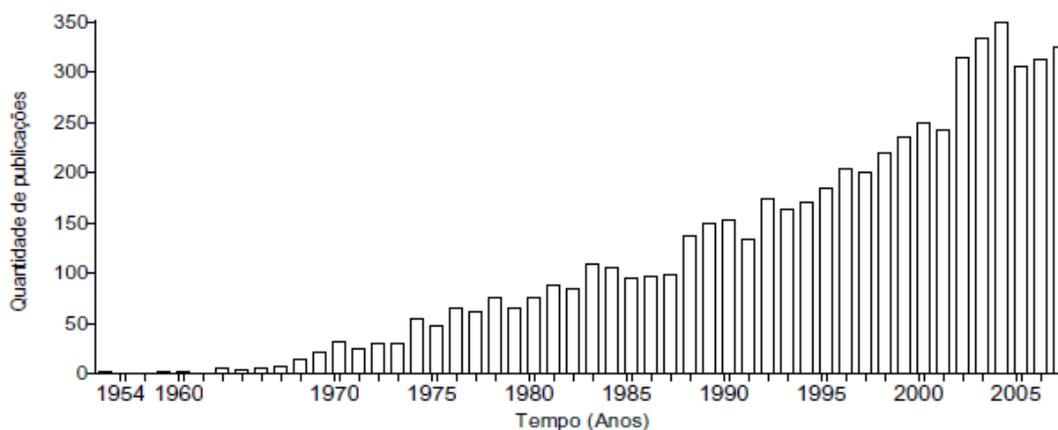


Figura 2: Gráfico da evolução do número de publicações científicas em periódicos internacionais indexados, referentes ao termo “imobilização celular”, nos últimos 50 anos (Fonte: Web of Science Data Base “on-line”). Fonte: Covizzi, et al., 2007.

2.3 ALGINATO

O alginato é um dos suportes mais utilizados para a imobilização de células microbianas, devido sua preparação requerer uma metodologia simples, além de ser uma técnica reprodutível que utiliza condições suaves durante o processo. Os alginatos são heteropolímeros lineares (Figura 3) de ácidos carboxílicos compostos de subunidades monoméricas de β -D-ácido manurônico e α -L-ácido gulurônico interligados por ligações 1,4-glicosídicas (KAWAGUTI; SATO, 2008). Podem ser extraídos de algas marrons ou serem obtidos de bactérias isoladas do solo. É comumente aplicado em indústrias de alimentos como material gelificante, estabilizante e espessante e nas indústrias farmacêuticas e biotecnológicas é utilizado para imobilizar células (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008).

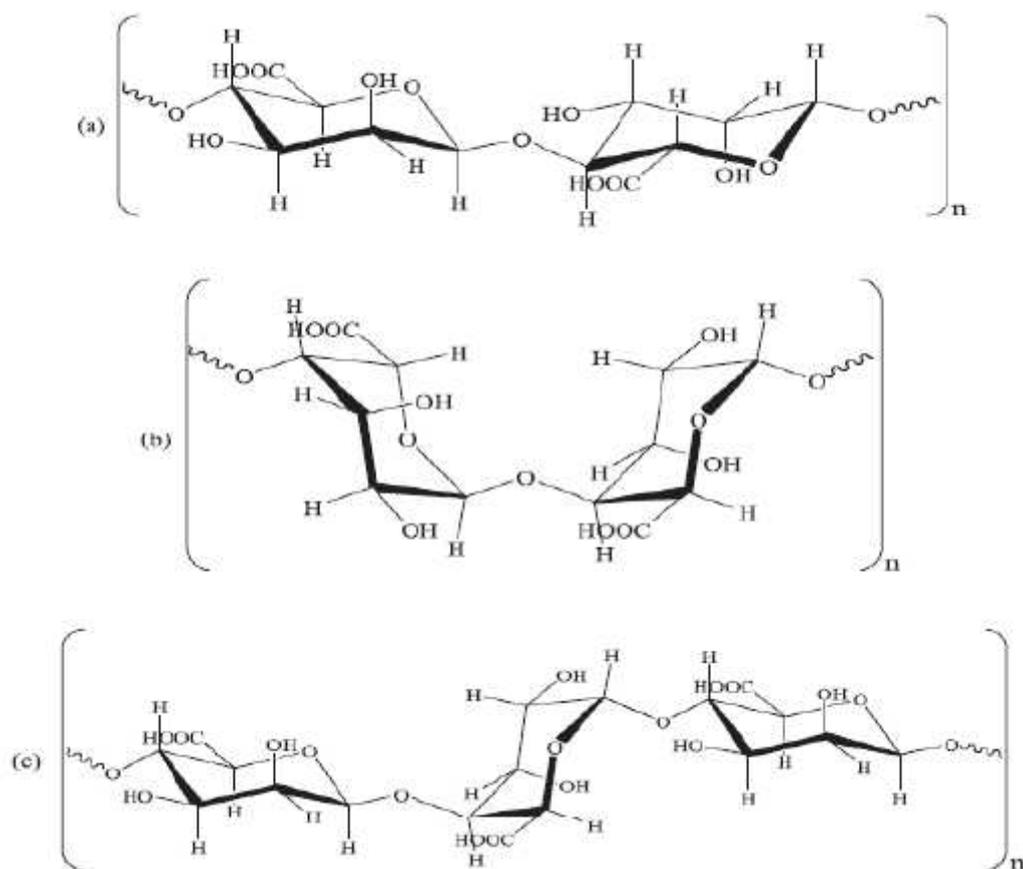


Figura 3: composição dos alginatos: a) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos; b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos; c) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos alternados. Adaptado de: Kawaguti e Sato, 2008; Rodrigues, 2010.

2.4 CARBOXIMETILCELULOSE

Segundo MANO (1999) o polímero Carboximetilcelulose (CMC) é obtido por meio de duas reações, tendo como precursor a celulose. Juste e Majewicz (1985) e Fujimoto et al., (2002) relatam que a carboximetilcelulose (CMC) é obtida via reação de Williamson, pelo tratamento de celulose com ácido monocloroacético em presença de excesso de hidróxido de sódio. O CMC é aplicado como espessante em cosméticos, alimentos, tecidos e tintas. A figura 4 mostra a estrutura química da carboximetilcelulose,

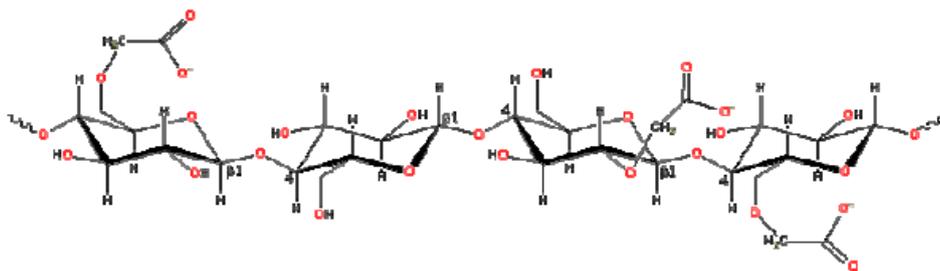


Figura 4: Estrutura química da Carboximetilcelulose. Fonte: KÄISTNER et al., 1996 & ROHR, 2007.

2.5 QUITOSANA

A Quitosana é utilizada como suporte para imobilização enzimática, devido o seu baixo custo, ser um produto renovável e biodegradável e apresentar importância econômica e ambiental. Sua produção é por meio de resíduos de carapaça da indústria pesqueira, uma tecnologia sustentável, pois, utiliza um subproduto gerado por um segmento da indústria que por meio de reações químicas pode ser utilizado como suporte para imobilizar enzimas (MENDES, 2011). O polímero Quitosana diferencia-se da celulose, segundo Krajewska (2004), na presença de grupos funcionais hidroxila (OH) e grupos amino (NH₂).

A quitosana é a forma desacetilada da quitina que só perde em abundância na natureza para a celulose. É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável. Indústrias produtoras de quitosana a partir da quitina estão situadas no Japão, onde produzem mais de 100 bilhões de toneladas de quitosana por ano, a partir de carapaças de caranguejo e camarão, pela reação de hidrólise alcalina via processo termoquímico (MENDES et al., 2011).

As variações mais importantes da quitosana segundo Mendes et al. (2011), são membranas e hidrogéis, os quais apresentam poros que são essenciais para ocorrer a imobilização de enzimas. A figura 5 mostra a estrutura química da quitosana.

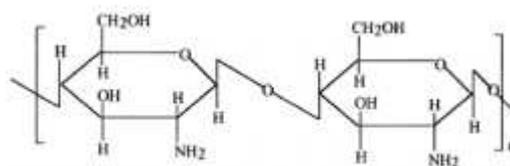


Figura 5: Estrutura química da Quitosana. Fonte: Azevedo et al., 2007.

2.6 PROCESSO SOL-GEL

A utilização do processo Sol-Gel iniciou-se no século XIX, em 1846, por meio de uma publicação no Lawrence Livermore National Laboratory, LLNL, onde foi preparado um metal alcóóxido a partir de SiCl_4 e álcool, porém só em 1939 a técnica de processo de materiais Sol-Gel foi utilizada em escala industrial pela Schott Glass, para deposição de camadas de óxidos sobre vidros (GEFFCKEN; BERGER; PATENT, 1939). O processo consiste na combinação de compostos inorgânicos e orgânicos, formando compostos híbridos, produzindo uma nova classe de materiais com diferentes propriedades.

O processo sol-gel é uma rota de síntese de materiais no qual num determinado momento ocorre uma transição do sistema sol para um sistema gel. O termo sol é definido como uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100 nm) estável em um fluido, enquanto o termo gel pode ser visto como um sistema formado por uma estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios (SILVA, 2009).

O interesse nos materiais obtidos através do processo Sol-Gel está na facilidade do processo. De acordo com Alves (2005) o processo sol-gel pode ser dividido em cinco etapas: formação do sol, gelificação, envelhecimento, secagem e densificação, sendo que a etapa de secagem é o ponto crítico, pois define o tipo de produto obtido através do processo sol-gel. A formação de sol-géis estão representados na Figura 6. Ocorre, primeiramente, uma hidrólise com a formação de um alcóóxido metálico (precursor) seguido de reações de condensação dos grupos hidroxila, a qual leva a formação do sol e, conseqüentemente a formação do gel (SILVA, 2009).

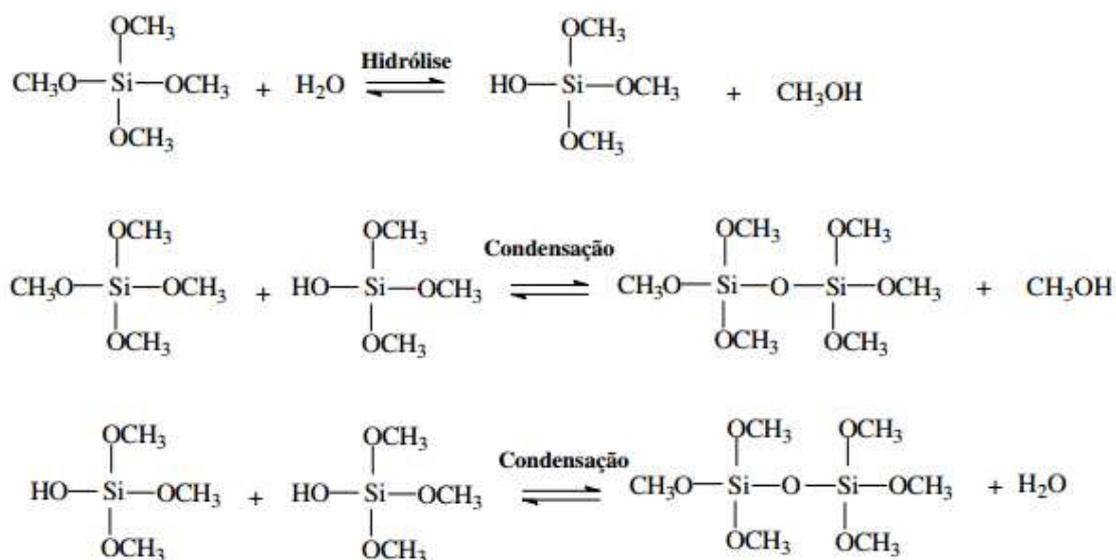


Figura 6: Reação química de hidrólise, seguida pela condensação para a síntese sol-gel. Fonte: SILVA (2009).

Para a caracterização físico-química do suporte, alguns autores (MENEZES; MACÊDO; JUNIOR, 2005; KOPP et al., 2012; JUNIOR, 2009) utilizam as seguintes análises: Termogravimetria (TG) que acompanha a variação da massa conforme aumenta-se a temperatura em uma câmara de aquecimento com balança, onde são coletados as medidas de massa em função da temperatura, avaliando a estabilidade do material e a calcinação de compostos orgânicos. A difração de raio X (DRX) é empregada para se avaliar a estrutura cristalina do composto formado, o equipamento incide raios sobre a amostra que são refratados e coletados por um coletor que, por meio de gráficos fornece a estrutura cristalina do composto formado. A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é empregada para visualizar a presença de poros no composto obtido após o processo sol-gel.

3- OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar novos suportes para imobilização enzimática aplicável a processos industriais a partir do processo sol-gel entre os compostos alginato, carboximetilcelulose e quitosana com polifosfato.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a estabilidade dos suportes;
- Avaliar a porosidade nos suportes;
- Avaliar a formação de cristais;

4- METODOLOGIA

O experimento foi desenvolvido em parceria entre a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Campus de Araraquara. A preparação do suporte foi realizada nos laboratórios da Faculdade de Ciências Biológicas (FCBA - UFGD) e as análises dos resultados foram feitas nos laboratórios do Instituto de Química da Unesp (IQ Unesp) – Araraquara.

Os materiais utilizados no experimento para a formação dos copolímeros foram cedidos pelo Professor Dr. Hernane Barud, do Instituto de Química da Unesp de Araraquara. Os compostos utilizados para a formação de copolímeros neste trabalho foram polifosfato (NaPO_3) da marca Merck; alginato de sódio com baixa viscosidade; carboximetilcelulose massa molar 90.000; quitosana da Aldrich, com massa molar média e cloreto de cálcio (CaCl_2).

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O projeto consistiu em avaliar o polifosfato combinado com diferentes materiais, tomando como padrão o polifosfato puro (100%). Foram empregados três tratamentos, sendo que o primeiro foi à combinação de polifosfato com alginato de sódio, o segundo foi à combinação de polifosfato com carboximetilcelulose (CMC) e o terceiro foi à combinação entre o polifosfato com a quitosana. A relação entre o polifosfato e os outros materiais foi respectivamente de 80% / 20% e de 50% / 50%, de modo que fosse avaliado o efeito do aumento da concentração dos polímeros naturais ao polifosfato.

5.2 FORMAÇÃO DOS XEROGÉIS

O procedimento utilizado para preparar os xerogéis foi o descrito por Kopp et al. (2012) com as modificações descritas abaixo. Na formação do xerogel pelo processo sol-gel o polifosfato foi determinado como padrão e o mesmo combinado o com Alginato de Sódio, carboximetilcelulose e quitosana. Para a formação do xerogel entre o polifosfato e o alginato de sódio foram aquecidos 98 mL de água a 60°C, sendo que, para a relação de 80% / 20% foi, respectivamente, dissolvido 3,2 g de polifosfato e 0,8 g de alginato de sódio e para a relação de 50% / 50% foi, respectivamente, dissolvido 2 g de polifosfato e 2 g de alginato de sódio, para a preparação do suporte. A mistura foi colocada em uma seringa e gotejada sobre uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) com concentração de 14,7 g.L⁻¹. Após esta etapa foi separado o sobrenadante do gel formado, sendo este, armazenado em cadinho de porcelana.

Para a formação do xerogel entre o polifosfato e carboximetilcelulose (CMC) o procedimento consistiu em dissolver 3,2 g polifosfato e 0,8 g de CMC em 98 mL de água, para obter a relação 80% / 20% e para a relação 50% / 50% utilizou-se 2 g de cada composto. Após este procedimento, a mistura foi gotejada numa solução de CaCl₂ com concentração de 14,7 g.L⁻¹. Após esta etapa foi separado o sobrenadante do gel formado, sendo este, armazenado em cadinho de porcelana.

A formação do xerogel entre o polifosfato e a quitosana foi feita pela dissolução de 3,2 g polifosfato de 0,8 g quitosana para obter a relação de 80% / 20% e para a relação de 50% / 50% foi utilizado 2 g de cada composto, sendo ambos dissolvidos em 98 mL de água, seguindo o procedimento realizado entre o polifosfato e a carboximetilcelulose. Após esta etapa foi separado o sobrenadante do gel formado, sendo este, armazenado em cadinho de porcelana. Todos os procedimentos após a formação do xerogel foram levados à estufa por 24 horas a 60°C para a completa formação do xerogel.

Após o período de 24 horas na estufa as amostras foram levadas a mufla por três dias, sendo que, a cada 24 horas foi aumentada a temperatura, que se iniciou em 300°C, passando a 400°C e por último a 500°C para tratamento térmico. Após esse período na mufla as amostras foram moídas com a utilização de cadinho e pistilo e peneiradas em peneiras Mesh com tamanho de 0,5 nm e as amostras foram armazenadas em tubos falcon.

5.3 ANÁLISES

As análises físico-químicas foram feitas no IQ da Unesp, onde foram utilizados os equipamentos de difração de raios X, termogravimetria, microscopia eletrônica de varredura.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A difração de raio X é uma importante análise comumente feita em materiais utilizados como suporte para imobilização de enzimas para identificar a composição de fases de materiais cristalinos (ALVES, 2005). A figura 7 mostra a análise DRX para o xerogel com diferentes concentrações de polifosfato e alginato de sódio, polifosfato e carboximetilcelulose e entre polifosfato e quitosana. A figura A, D e G é o polifosfato padrão (100%), nela observa-se uma estrutura cristalina mais organizada, bem distribuída no plano. As figuras 7 B, E e H são, respectivamente a combinação entre o polifosfato com o alginato de sódio, a carboximetilcelulose e a quitosana, na proporção de (80%) para o polifosfato e de 20% para os outros materiais. O arranjo da estrutura cristalina sofre maior alteração pela quitosana do que para o alginato e o cMC. Isso pode ser explicado devido à estrutura química das moléculas, sendo que a quitosana apresenta a menor conformação estrutural do que a carboximetilcelulose e o alginato, o que favorece a formação de poros e a interação entre os materiais, possibilitando o uso como suporte para imobilizar enzimas. Isso se observa pela redução dos picos.

Na Figura 7 C, F e I, a proporção entre o polifosfato e o alginato, carboximetilcelulose e quitosana foi de 50% para cada. A estrutura cristalina foi modificada pelo aumento da proporção dos materiais carboximetilcelulose e quitosana frente ao polifosfato padrão e o alginato.

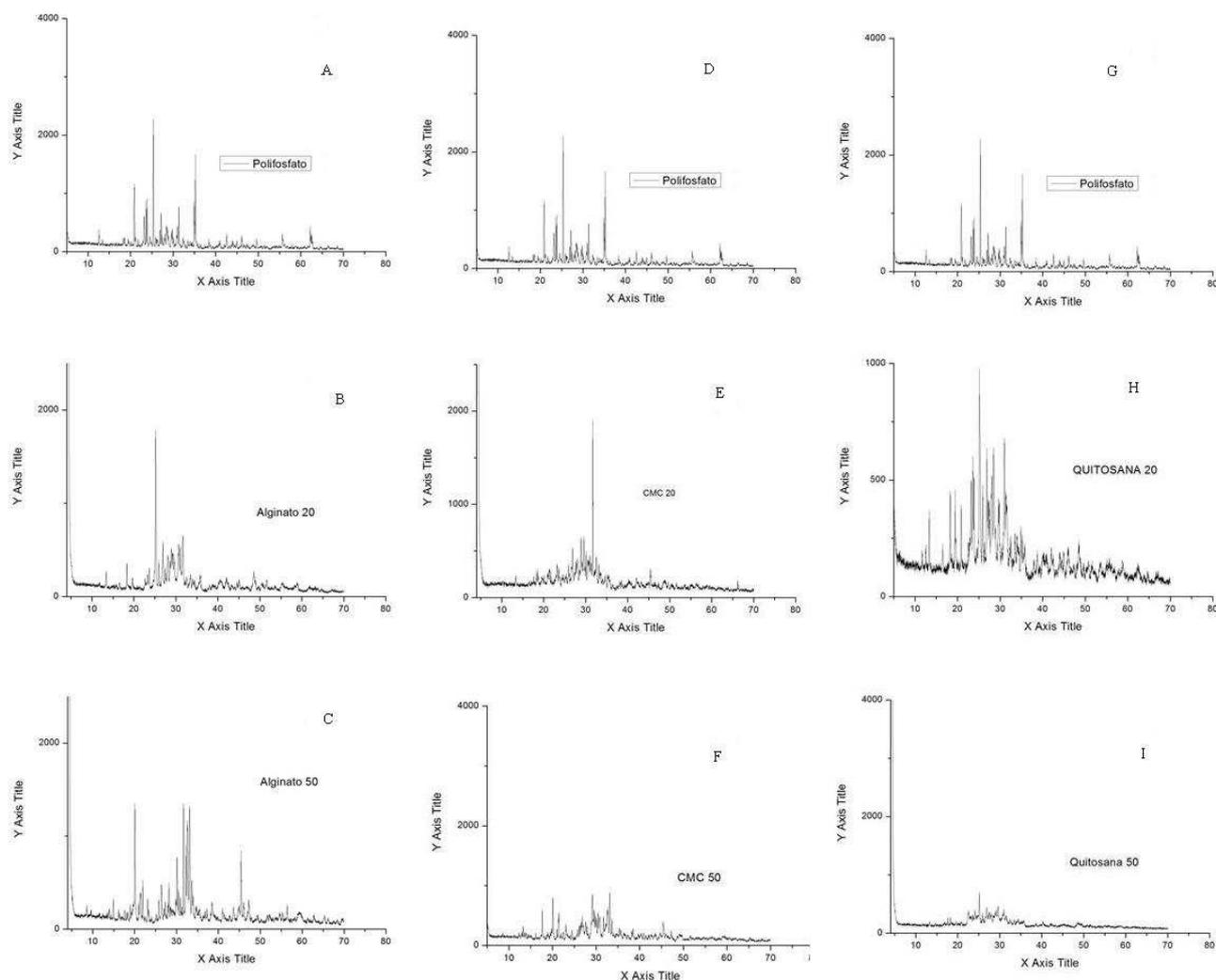


Figura 7: Análise de DRX do xerogel obtido por processo sol-gel entre polifosfato e alginato de sódio. Sendo A, D e G o polifosfato controle (100%). 7- B, E e H, respectivamente o polifosfato (80%) combinado com o alginato (20%), carboximetilcelulose (20%) e quitosana (20%) e C, F e I é a combinação 50% entre os materiais.

Por essa análise, deduz-se que a quitosana é o melhor agente modificador estrutural do Polifosfato, indicando de forma indireta que pode ser o melhor suporte para imobilização enzimática.

A análise de termogravimetria (TG) relaciona a perda de massa com o aumento de temperatura, ou seja, fornece dados sobre a estabilidade térmica da amostra, como mostrado na Figura 8. O comportamento constante do polifosfato é explicado pela sua característica química, que por ser um precursor vítreo ele não sofre degradação química quando submetido ao aquecimento, como observado na figura 8 A, 9 A e 10 A. No entanto a variação na análise térmica pode ser atribuída a presença de água ou algum reagente para a formação do xerogel (MELO, 2011). A figura 8 B apresenta uma constante entre o polifosfato e o alginato,

mostrando uma forte interação entre esses compostos. A figura 8 C mostra uma queda na porcentagem de massa após os 500°C indicando que o tratamento térmico foi eficaz (KOPP et al, 2012).

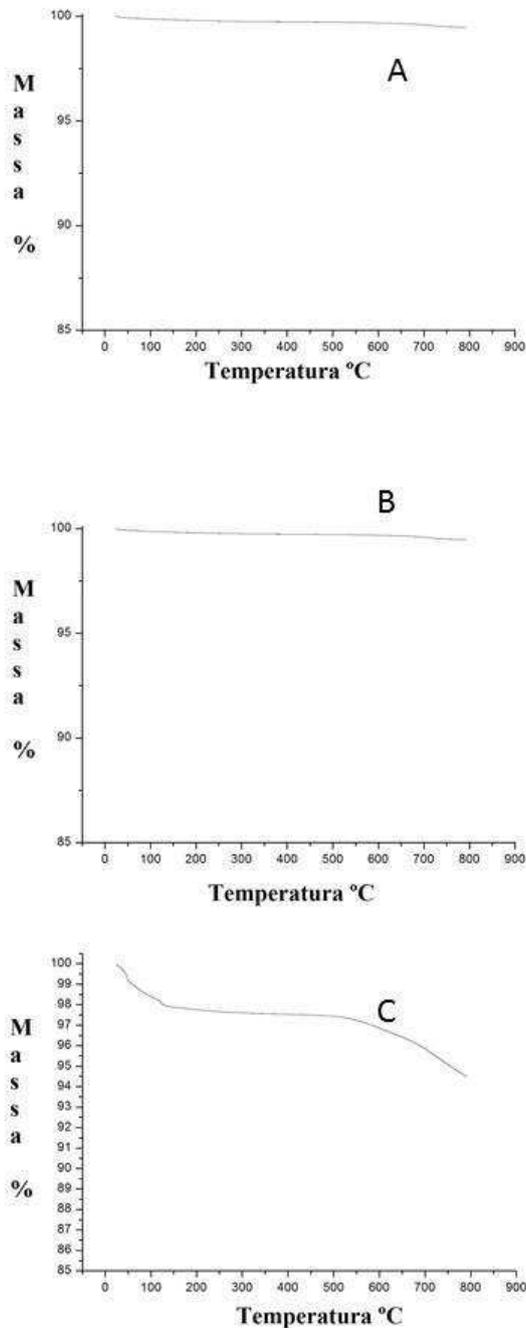


Figura 8: Análise de Termogravimetria do xerogel formado por processo sol-gel entre o polifosfato e o alginato de sódio. A figura 8-A é o polifosfato padrão (100%). A figura 8-B é o polifosfato (80%) combinado com alginato (20%) e a figura 8-C é a combinação 50% / 50% entre os materiais.

Já na Figura 9 B, cujo o xerogel é formado de polifosfato e carboximetilcelulose, com concentração de 80% de polifosfato e de 20% de carboximetilcelulose, observa-se uma perda maior de massa, sendo responsável por esta característica a carboximetilcelulose, ou a presença de água, no entanto verifica-se que o tratamento térmico descrito na metodologia foi eficaz, pois acima de 500°C é que a amostra sofre perda de massa acentuada. Na Figura 9 C, no qual o xerogel é composto de 50% de polifosfato e de 50% de carboximetilcelulose, observa-se uma perda de massa acentuada no início da análise indicando que a interação entre o polifosfato e a carboximetilcelulose diminui a característica de composto vítreo que o polifosfato apresenta, indicando degradação da porção orgânica que pode resultar no aumento da porosidade, o que é desejável para a imobilização.

Na figura 10 a copolimerização entre o polifosfato 80% e a quitosana 20% indicou uma perda de massa acentuada após os 500 °C, onde, novamente o tratamento térmico foi eficaz conforme indicado por Kopp et al. (2012), no entanto, nota-se uma pequena variação quando comparado ao padrão, fator que pode ser atribuído à interação entre o polifosfato e a quitosana e também a presença de água, como citado anteriormente. A figura 10-C foi a que apresentou queda constante, onde a maior proporção de quitosana afetou o comportamento vítreo do polifosfato, fazendo com que o aumento de temperatura ocasiona uma maior perda de massa. Nota-se também que o tratamento térmico foi pouco eficaz para essa análise, porém, essa queda desde antes dos 100°C pode ser justificada pelo aumento da proporção de quitosana (50 % / 50%) e pela possível presença de água na amostra.

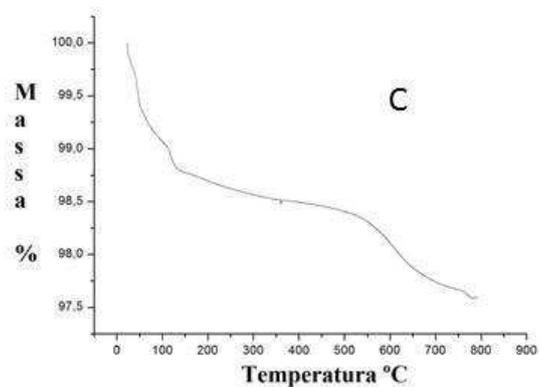
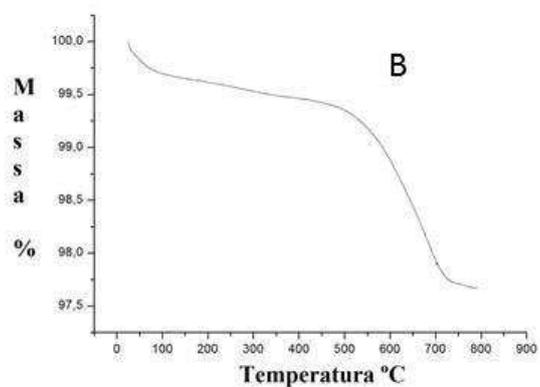
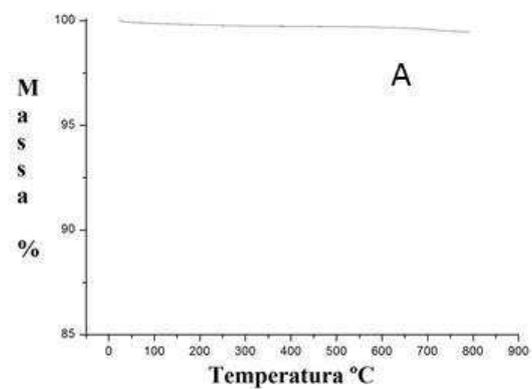


Figura 9: Análise de termogravimetria do xerogel formado por processo sol-gel entre o polifosfato e a carboximetilcelulose. A figura 9-A é o polifosfato padrão (100%). A figura 9-B é o polifosfato (80%) combinado com carboximetilcelulose (20%) e a figura 9-C é a combinação 50% entre os materiais.

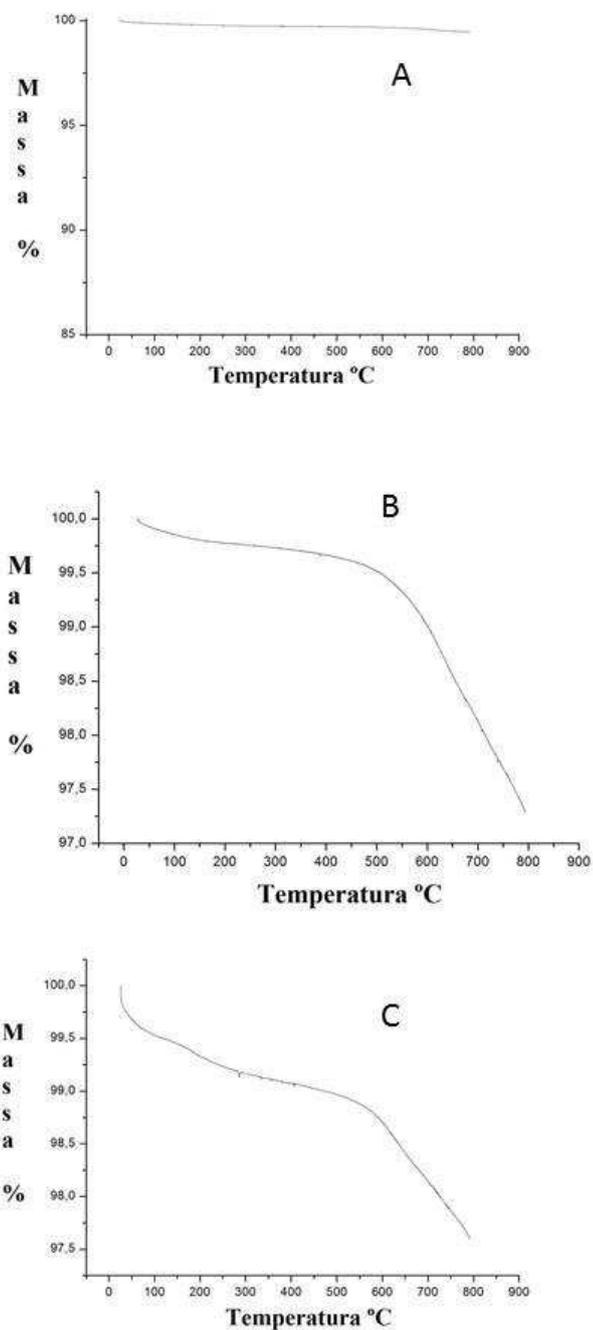


Figura 10: Análise de termogravimetria do xerogel formado por processo sol-gel entre o polifosfato e a quitosana. A figura 10-A é o polifosfato padrão, a figura 10-B é o polifosfato (80%) combinado com quitosana (20%) e a figura 10-C é a combinação 50% / 50% entre os materiais.

Com as análises de termogravimetria (TG) também podemos indicar como melhor material a quitosana, pela acentuada perda de massa indicando degradação da porção orgânica e conseqüente aumento de área específica, que ocorre com maior intensidade na combinação entre o polifosfato e a quitosana com 50% de cada material.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca. Por meio da análise do MEV podemos ver claramente a afinidade entre os copolímeros, diminuindo a característica de composto vítreo do polifosfato. Todas as figuras abaixo estão aproximadas 20.000 vezes.

A Figura 11-A mostra as características do polifosfato que é um composto vítreo. A figura 11-B mostra a interação entre o polifosfato e o alginato na proporção de 80% / 20% que modificou a característica de composto vítreo, levando-o a apresentar camadas, no entanto, como visto na análise TG a característica de composto vítreo não é alterada. A figura 11-C, onde a amostra contém 50% de cada material percebe-se a presença de poros, porém o aspecto de camadas da figura B não é apresentado na figura C, que pode ter ocorrido devido a perda de massa verificada na análise TG.

A figura 12 é a combinação entre o polifosfato e a carboximetilcelulose (CMC), sendo o A é o polifosfato padrão (100%) o B contém 80% de polifosfato e 20% de carboximetilcelulose e C que contém 50% de cada material. A diferença observada fica por conta da figura B, onde visualiza-se um material composto por camadas, diferente daquele observado na figura A, que apresenta características de um composto vítreo. A figura C apesar da semelhança com a figura A, a característica vítrea é descartada analisando as imagens de TG, que mostra uma queda no percentual de massa logo no início da análise, descaracterizando o copolímero como composto vítreo.

A figura 13-B e 13-C mostra alta interação entre o polifosfato e a quitosana. Na imagem é possível ver a formação de camadas, que são importantes para a imobilização de enzimas. A aparência, conforme o aumento da proporção de quitosana se distancia da aparência do composto vítreo. De acordo com a análise TG a proporção 50% de cada material ocorre uma perda de massa com temperaturas relativamente baixas, sendo essa característica atribuída a quitosana. Em ambas a proporção de quitosana em relação ao polifosfato ficou evidenciada que a estrutura cristalina foi alterada o que corrobora com a análise de DRX.

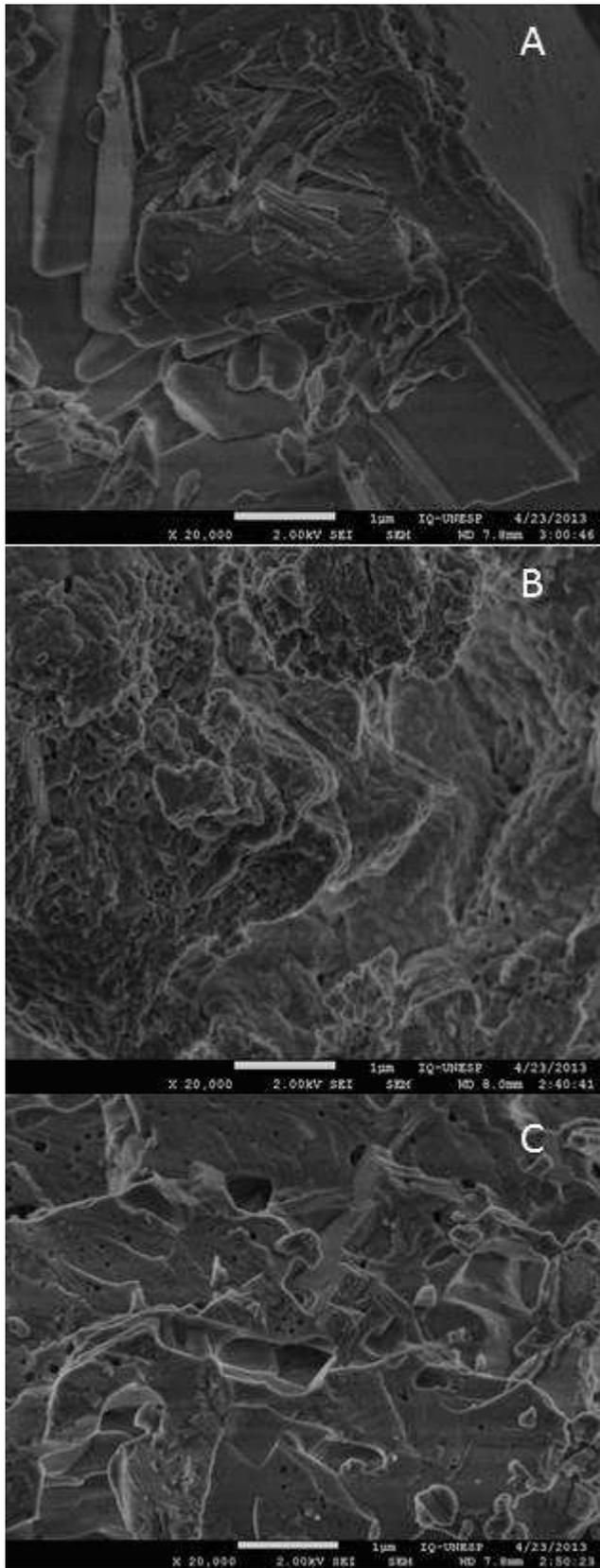


Figura 11: Análise de microscopia eletrônica de varredura com aumento de 20.000 vezes, onde o A é o polifosfato 100%, o B é o polifosfato (80%) e alginato(20%) e o C é o polifosfato (50%) alginato (50%).

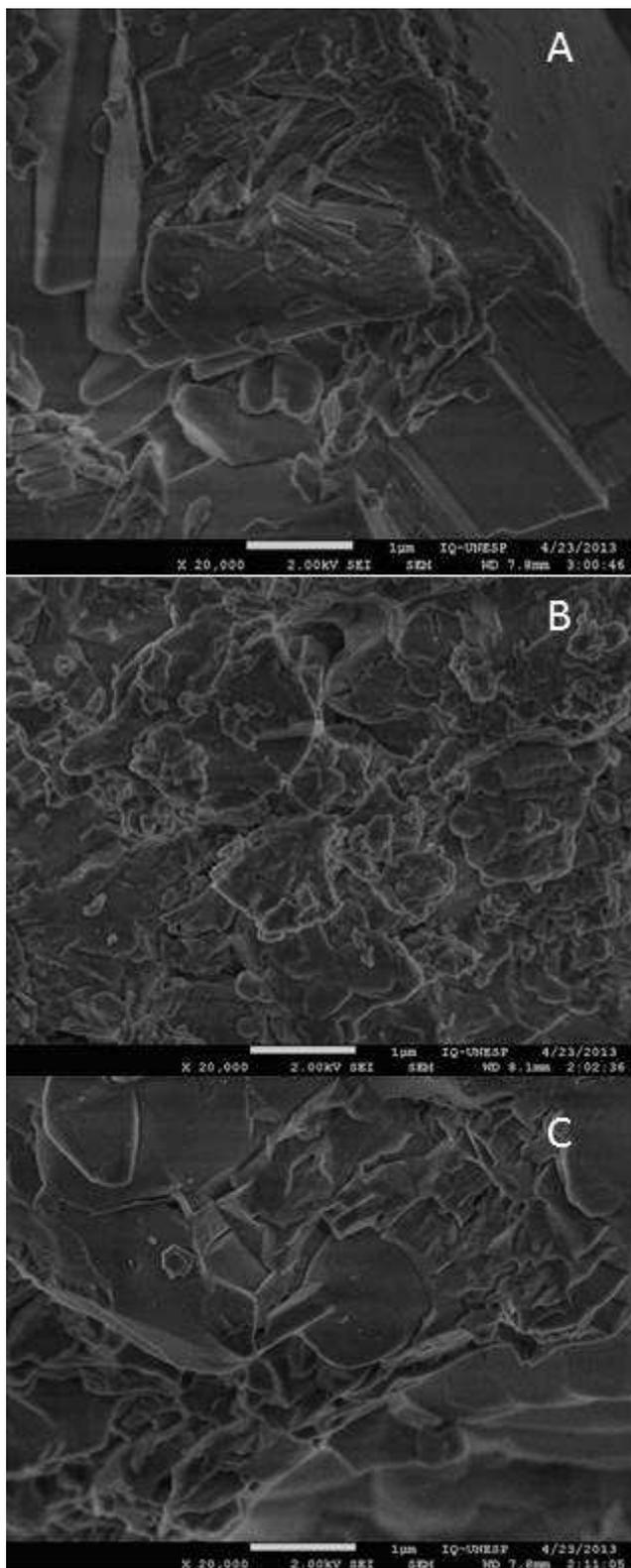


Figura 12: Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura com aumento de 20.000 vezes, onde o A é o polifosfato 100%, o B é o polifosfato (80%) e carboximetilcelulose (20%) e o C é o polifosfato (50%) e CMC (50%).

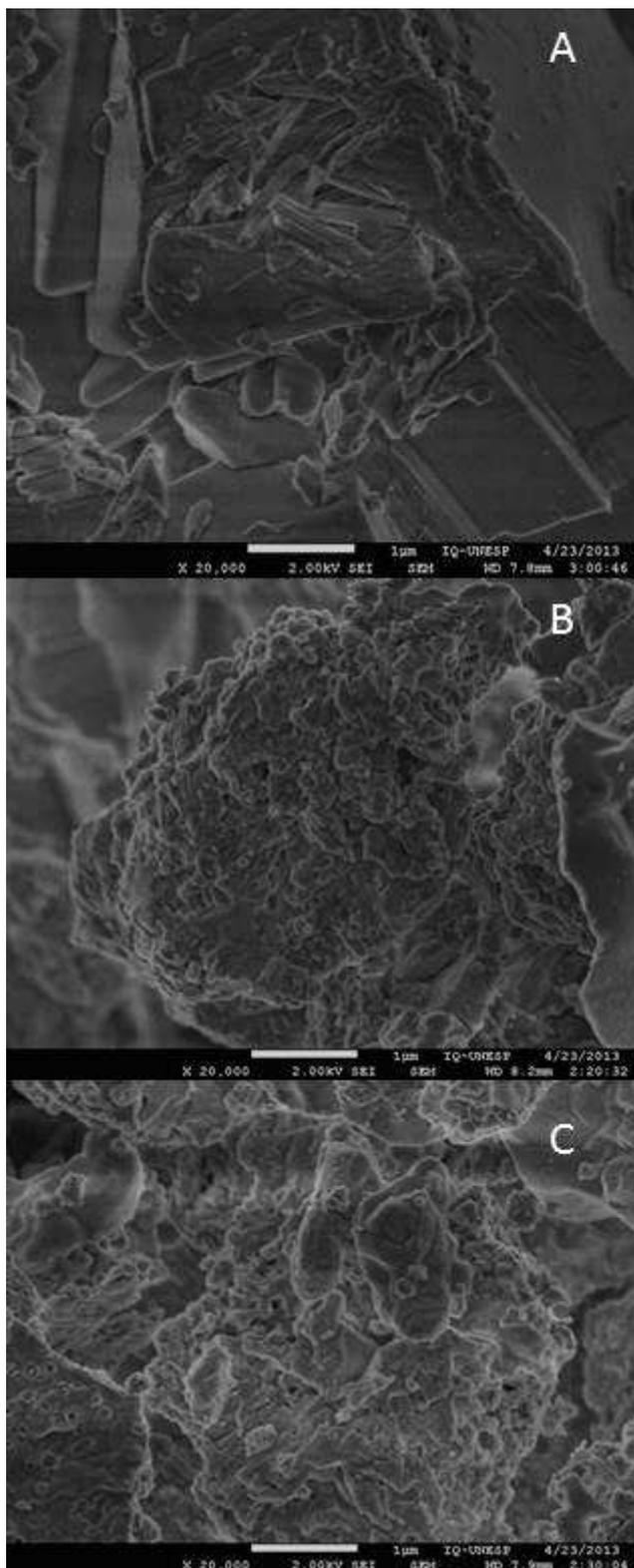


Figura 13: Análise de microscopia eletrônica de varredura com aumento de 20.000 vezes, onde o A é o polifosfato 100%, o B é o polifosfato (80%) e quitosana (20%) e o C é o polifosfato (50%) e quitosana (50%).

6- CONCLUSÃO

A partir da técnica sol-gel é possível construir suportes com diferentes características, como o observado pelo trabalho. A perda de massa mostrou ser um fator que mereça atenção, principalmente na combinação entre o polifosfato e carboximetilcelulose e polifosfato e a quitosana com iguais proporções, no qual de fato a análise de DRX mostrou que a característica vítrea do polifosfato padrão foi modificada pela combinação com esses dois materiais, justificando a grande perda de massa indicando aumento de área superficial. Das combinações testadas todas apresentaram ganhos no que tange às características de material para imobilização de enzimas, mas a combinação com quitosana foi a que apresentou melhor potencial indicando a possibilidade de maior área específica por grama de material. Com resultados de BET (Braunauer, Emmet e Teller), método de análise de superfície essa tendência poderá ser confirmada.

7- REFERÊNCIAS

- ALVES, A. K. “Obtenção e controle da morfologia de aluminas sintetizadas por sol-gel”. Dissertação (Mestrado em Engenharia – Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2005.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A. BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. “Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais”. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v.2.3 27-34, 2007.
- BARBOSA, A, dos S.; “Formação de aerogel com biocatalisadores imobilizados na presença de líquido iônico”. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial – Biotecnologia Industrial). Aracaju, Sergipe. 2013.
- BARBOSA, A. dos S. “Formação de aerogel com biocatalisadores imobilizados na presença de líquido iônico”. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe. 2011.
- BEYNUM, G.M.A. “Immobilized biocatalysts”. Biotechnology Letters. v.2, p.127-132, 1980.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. “Enzimas em Biotecnologia”. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 6. 124 - 147. 2008.
- CAMPESTRINI, E.; da SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D.; “Utilização de enzimas na alimentação animal”. Revista Eletrônica Nutritime, v.2, n°6, 259-272, novembro/dezembro 2005.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W. de.; SILVA, J. B. de A. e. “Biocatalizadores imobilizados”. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, ano IX, 48-57 – n°36. Janeiro – Junho, 2006.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. de; CASS, Q. B.” Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas”. Quim. Nova, Vol. 32, No. 1, 175-187, 2009.
- CARVALHO, V.; CANILHA, L.; da SILVA, S. S. “Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos”. Revista Analytica, Junho/Julho, n° 23, 60-70. 2006.
- CHIBATA, I. “Immobilized Enzyme- Research and Development”. Tokyo:Kadansha Ltd, 1978.
- COMPANIES AND MARKETS <<http://www.companiesandmarkets.com>> Acesso em: 20/01/2014.

CORCORAN, E. "The production and use of immobilized living microbial cells". In Wiseman, A. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. England: Ellis Horwood, v.10 p.12-50, 1985.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; DA SILVA, R. "Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas" Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 28, n.2, 143-160, jul./dez. 2007.

da SILVA, S. A. P.; "Biorremediação em águas residuais: remoção de fosfatos utilizando microalgas *Chlorella vulgaris* imobilizadas em meio de alginato de sódio". Dissertação (Mestrado em Hidrologia), Universidade de Porto, Portugal. 2007.

DE CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. "Biocatálise: avanços recentes". Quim. Nova, Vol. 24, No. 4, 672-675, 2001.

DOS SANTOS, A. F. "Imobilização de invertase comercial e de "*Saccharomyces cerevisiae*" em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar". Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas – Alimentos e nutrição) Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara, São Paulo. 2010.

DURAN, P. M.; BAILEY, J. E. "Effects of immobilization on growth, fermentation properties and macromolecular compositions of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin". Biotechnology and Bioengineering, v.28, 73-87, 1986.

FENICE, M.; FEDERICI, F.; SELBMANN, L.; PETRUCCIOLI, M. "Repeated-batch production of pigments by immobilized *Monascus purpureus*". *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 80, n. 3, 271-276, 2000.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPS, F. M. "Técnicas de imobilização de enzimas". Revista Processos Químicos, artigo quatro. 2010.

FUJIMOTO, J, REIS, E. A. de O.; Petri, D. F. S. & Campana Filho, S; P. "Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína". *Química Nova*, 25(5), 757-761, 2002.

GALVÃO, C. M. A. "Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes". Tese (Doutorado em engenharia química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, São Paulo. 191. 2004.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. "Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção". *Química nova*, v.31, 1800-1806, 2008.

GEFFCKEN, W.; BERGEN, E.; Patente Alemã 736411, 6 Maio 1939.

GERBSCH, N.; BOCHHOLZ, R. "New processes and actual trends in biotechnology". *FEMS Microbiology Reviews*, v.16, 259-269, 1995.

GUISAN, J. M. "Immobilization of Enzymes and Cells"; Guisan J. M., ed.; Humana Press: Totowa, cap. 1. 2006.

GÜRSEL, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAĞCI, T.; “Immunizations of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers”. *Reactive & Functional Polymers*, v.57, p. 57-65, 2003.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 235. 2006.

ISIK, S.; ALKAN, S.; TOPPARES, L. CIANGA, I.; TAGCI, Y. “Immunobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-mehtylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices”. *European Polymer Journal*, v.39, p. 2375-2381, 2003.

JUNIOR, J. da S.; “Obtenção de xerogel de sílica a partir das cascas de arroz em uma aproximação ‘bottom-up’ para produção de materiais em eletrônica”. *Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica)*. Florianópolis, Santa Catarina. 2009.

JUSTE, K. E.; MAJEWICZ, T. G. “Encyclopedia of polymer science and engineering”. Kroschwitz, J. I., 2nd ed.; John Wiley & Sons: New York, v.3, 226, 1985.

KÄISTNER, U., HOFFMANN, H., DÖNGES R. AND HILBIG, J. “Structure and solution properties of sodium carboxymethyl cellulose”. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.* 307-328), 1997.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. “Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana”. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 1, 134-143, 2008.

KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S. “Enzyme Immobilization”. *Journal Biotechnology*, v.7a, 347-404,1987.

KOPP, W.; BARUD, H. S.; PAZ, M. F.; BUENO, L. A.; GIORDANO, R. L. C.; RIBEIRO, S. J. L.; “Calcium polyphosphate coacervates: effects of thermal treatment”. *Springer, J Sol-Gel Sci. Technol.* DOI 10.1007/s10971-012-2749-z. 2012.

KRAJEWSKA, B. *Enzyme Microb. Technol.*, 35, 126. 2004.

MANO, E. B. & MENDES, L. C; *Introdução a polímeros*, 2^a ed., Edgard Blücher Ltda: São Paulo, 1999.

MELO, A. D. de Q.; “Estudo da utilização de coacervatos de polifosfato de sódio na obtenção de materiais com nanopartículas metálicas e magnéticas”. *Dissertação (Mestrado em Química – Química Orgânica)*. Fortaleza, Ceará. 2011.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. de.; CASTRO, H. F. DE.; GIORDANO, R. DE. L. C. “Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial” *Quim. Nova*, Vol. 34, No. 5, 831-840, 2011.

MENEZES, J. C. A.; MACÊDO, M. A.; JUNIOR, E. A. S. “Filmes finos de LiMn₂O₄ via processo Sol-Gel protéico”. *Scientia Plena* 1 (1): 23-29, 2005.

RODRIGUES, H. D. P., “Potencial biossortivo e biodegradativo das células de *saccharomyces cerevisiae*” livres e imobilizadas em alginato de cálcio na remoção de corantes têxteis”. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Mibrobiologia Aplicada) Unesp, Rio Claro, São Paulo. 2010.

ROHR, T. G. “Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano”. Dissertação (Mestrado em Ciências – Tecnologia Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

SILVA, R. G. da C. “Materiais sorventes impressos molecularmente preparados por processo sol-gel”. Tese (Doutorado em Química – Química Analítica). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo. 2009.

WILLIAMS, D.; MUNNECKE, D. M. “The production of etanol by immobilized yeast cells”. *Biotechnology and Bioengineering*, v.23, 1813-1825, 1981.